

## Optimization of Production Yield for Neohesperidin by Response Surface Methodology

Hee-Jong Yang, Seong-Yeop Jeong, Nack-Shick Choi, Keug-Hyun Ahn, Chan-Sun Park,  
Byoung-Dae Yoon, Yeon-Woo Ryu<sup>1</sup>, Soon-Cheol Ahn<sup>2</sup> and Min-Soo Kim\**Bioindustrial Process Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Jeonbuk 580-185, Korea*<sup>1</sup>*Department of Molecular Science and Technology, Ajou University, Suwon 443-749, Korea*<sup>2</sup>*Department of Microbiology and Immunology, College of Medicine, Pusan National University, Busan 602-739, Korea*

Received September 8, 2010 / Accepted November 16, 2010

Neohesperidin is a natural new nutrition sweetener, widely existing in plants of dry citrus peel, which can be derived from extraction. Since the sweetness is 1,300-1,500 times greater than that of sugar, neohesperidin are widely used in fruit juices, wines, beverages, bakeries and pharmaceutical formulations, and are particularly suitable for consumption by diabetic patients. However, the yield of extraction from citrus peel waste is very low. In this study optimal yield conditions were determined using response surface methodology (RSM) in order to increase the neohesperidin extraction yield. The critical factors for maximum extraction yield were selected extraction pressure ( $x_1$ ), extraction time ( $x_2$ ), and concentration of ethanol ( $x_3$ ). As a result, the extraction yield was improved when the extracting pressure increased. The extraction yield also increased in a time-dependent manner. When adding ethanol as an assistance solvent to the supercritical carbon dioxide, extraction yield was increased as more ethanol concentration was added. Finally, the extraction yield of neohesperidin was improved to about 162.22% compared to ethanol extraction as a conventional method.

**Key words** : Neohesperidin, response surface methodology, citrus unshiu, central composite design

## 서 론

감귤(*Citrus unshiu*)에는 다양한 약효성분이 함유되어 예로부터 한방이나 생약의 원료로 사용되어 왔으며, 우리나라는 기상 및 지리학적으로 감귤 재배지 중 최북단에 위치하고 있어서 내한성이 강한 만다린계의 온주밀감인 감귤 생산의 주종을 이루고 있다[12,13].

감귤류에는 flavonoid, carotenoid, coumarin, polyphenol 등의 다양한 화합물이 함유되어 있으며, 특히 rutin 및 deosmine 등의 일반적인 flavonoid 류, hesperidin, naringin 등 citrus 과일 특유의 flavonoid 류, 또한 채소나 과일에서 보고되지 않는 감귤류 고유의 tangeretin, nobietin 류 등의 flavonoid 류가 함유되어 있다[3,15]. 감귤류에는 지금까지 약 60여 종의 생리활성 물질이 밝혀져 있으며, 감귤류 특유의 flavone을 함유하여 기능성에 대한 평가도 다양한 방향에서 검토되고 있다[13,19]. 감귤류 유래 화합물은 항산화 작용[4], 항암[5,6], 항균[2], 고혈압 예방[23], 혈중 LDL 콜레스테롤 함량 감소 및 HDL 콜레스테롤 증진 효과[20,24] 등 다양한 생리적 활성을 나타낸다고 보고되어 있다. 특히 neohesperidin은 위염에 대한 보호 작용[16], 멜라닌 합성 억제 효과[10], 피부염에 대한 항알레르기 효과[9] 및 간암 세포의 증식 억제 효과[1]

등의 약리 효과가 보고되어 있다. 또한 neohesperidin은 고감도감미료인 neohesperidin dihydrochalcone (NHDC)으로 화학적 변환이 가능하여[8] 최근 neohesperidin의 상업적 제조 기술에 대한 관심이 모아지고 있다.

Neohesperidin은 감귤류에 많이 함유되어 있는 것으로 알려져 있으며, 특히 지각(*Aurantii Fructus Immaturus*), 당유자(*Citrus grandis* Osbeck) 등에 많이 함유되어 있으며, Wang 등 [25]은 microwave-assist extraction method (MAE)와 high-speed counter-current chromatography (HSCCC)를 이용하여 지각 10 g으로부터 159.5 mg의 neohesperidin을 추출하였다고 보고하였다. 감귤류 내 neohesperidin의 함량은 감귤의 품종 및 수확시기에 따라 차이가 있는 것으로 알려져 있으며, 국내 감귤류 중에서 neohesperidin의 함량이 가장 높은 것으로 알려진 지각의 경우, 201.23~79.68 mg/ml (착즙액), 당유자의 경우 197.84~86.65 mg/ml (착즙액)을 함유하고 있으며[14], 추출 방식에 따라 다소 함량의 차이를 나타내는 것으로 알려져 있다[17].

제주에서 생산되는 감귤 중 약 40% 정도만이 주스, 젤리, 초코렛 등으로 가공되고 있으며, 가공되고 남은 폐감귤박은 폐기물로서 버려지고 있는 상황이다. 감귤 가공 후의 부산물인 감귤박은 제주에서만 연간 약 5~6만 톤 가량이 발생하고 있으며, 이들 대부분은 감귤가공 부산물의 대부분은 해양 투기되고 있어 해양 환경오염의 원인이 되고 있다. 유기성 폐기물의 해양투기가 2012년부터 전면 금지됨에 따라 감귤가공부

**\*Corresponding author**Tel : +82-63-570-5220, Fax : +82-63-570-5219  
E-mail : ms5732@kribb.re.kr

산물의 처리가 시급한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 대부분 폐기되고 있는 감귤 과피의 유용성분 중의 하나인 neohesperidin의 초임계 이산화탄소를 이용한 감귤박의 추출 수율 증가를 위하여 통계학적 실험방법 중 하나인 반응표면 분석법 중 중심합성계획법을 적용해 추출 수율에 영향을 미치는 여러 인자들을 확인하고, 각 인자의 최적화를 통하여 추출 수율의 증대를 도모하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 시료 제조 및 보관

국내에서 주로 재배되는 감귤 재배 품종 중 당유자(*Citrus grandis* Osbeck), 감자(*C. benikoji* Hort. Ex Tanaka), 동정귤(*C. erythroa* Hort. Ex Tanaka), 병귤(*C. platyamma* Hort. Ex Tanaka), 빈귤(*C. leicarpa* Hort. Ex Tanaka), 일반조생(*C. unshiu*), 진귤(*C. sunki* Hort. Ex Tanaka), 평귤(*C. tangerina* Hort. Ex Tanaka), 홍귤(*C. tachibana*), 지각(*C. aurantium* Linn), 유자(*C. junos*)를 사용하였으며, 특용작물이나 관상용으로서 재배하는 품종의 경우 재배 농가로부터 제공받았다. 그러나 대부분 특용작물로서 재배되고 있기 때문에 원료수급의 문제점을 감안하여 주로 일반조생의 부산물을 본 실험에 사용하였다. 모든 시료는 증류수로 3회 세척한 후, 감귤 과피만을 사용하였다. 감귤 과피는 1차적으로 음지에서 자연 건조시킨 후 최종적으로 동결 건조하여 분말화하였다. 건조 분말화된 감귤과피는 3,000 rpm의 분쇄기(Hanil, Korea)에서 분쇄한 후, -20℃ 냉동고에 보관하면서 시료로 사용하였다.

#### 분석조건

플라보노이드의 분석은 high performance liquid chromatography (Shimadzu, Japan)을 이용하여 분석하였다. 분석용 컬럼은 Capcell pak C18 UG120 (4.6x250 mm, Shiseido Fine Chemicals Co., Japan), 이동상 용매로는 50 mM phosphoric acid (A)와 methanol (B)을 사용하였다. Gradient elution은 80:20(A:B)에서부터 40분 후 20:80(A:B), flow rate는 0.7 ml/min으로 하여 UV 검출기 280 nm에서 분석하였다[11].

#### 에탄올 추출

분말화된 시료 1 g을 취하여 주정용 에탄올(95%) 20 ml를 가하여 4시간 동안 상온에서 추출하였다. 추출액을 냉각 한 후 Whatman No.1 여과지로 여과하고 동일한 용매로 수기를

2-3 회 세척하여 25 ml로 정용하였다. 얻어진 추출 시료를 0.45 µm filter로 여과한 후 HPLC로 분석하였다[21].

#### 초임계 이산화탄소 추출

초임계유체 추출장치는 최대 압력이 45.5 MPa까지 사용 가능하도록 제작하였으며, 초임계유체 추출장치는 이산화탄소와 보조용매용 고압용 펌프, 펌프 조절기가 장착되는 고압 챔버와 유량 조절장치, 그리고 온도 조절을 위한 열교환기로 구성되도록 하였다. 이산화탄소는 추출조건은 추출압력(13.2~40.0 MPa), 추출시간(0~120 min), 보조용매로서 ethanol의 농도(0~40%)를 달리하여 추출하였으며, 추출 온도는 50℃, 고압 syringe pump의 유속은 1.5 ml/min로 고정하여 추출하였다. 이산화탄소와 분리된 추출물은 용매가 채워진 바이알에 포집한 뒤 보조용매로 정용하여 -20℃에서 저장하여 분석용으로 사용하였다. Neohesperidin의 농도 결정은 저장된 추출물 1 ml을 취하여 HPLC를 이용하여 분석하였다.

#### 실험모델의 계획

감귤가공부산물로부터 초임계 이산화탄소에 의한 neohesperidin의 추출 조건을 최적화하기 위하여 반응표면분석법을 사용하였다. 이때 실험적인 코드디자인에 사용된 인자는 Table 1에 나타내었다. 중심합성계획법에 의한 요인(독립변수)의 실험계획은 추출압력( $x_1$ , 16.1~45.7 MPa), 추출시간( $x_2$ , 0~80 min), 보조용매의 농도( $x_3$ , 0~40%)를 5단계(-2, -1, 0, 1, 2)로 부호화하여 추출실험을 실시하였다(Table 1). 또한 아래의 코드 값 변환식[식1~3]과 같이 변수 변환을 하여  $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$  값을 결정하였다.

$$x_1 = \frac{pressure - 30.9}{7.4} \quad [식 1]$$

$$x_2 = \frac{time - 40}{20} \quad [식 2]$$

$$x_3 = \frac{ethanol - 20}{10} \quad [식 3]$$

이들 요인 변수에 의해 영향을 받는 종속 변수로는 neohesperidin의 추출수율(Y)을 선택하였으며, 3회(중심점 4회) 반복 실험하여 평균값을 회귀분석에 이용하였다. 이때 세 개의 독립변수와 종속변수에 대한 2차 회귀 모형식은 아래와 같다[식 4].

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{11}x_1x_1 + \beta_{21}x_2x_1 + \beta_{22}x_2x_2 + \beta_{31}x_3x_1 + \beta_{32}x_3x_2 + \beta_{33}x_3x_3 \quad [식 4]$$

Table 1. Code and experimental conditions for the central composite design

Factor	Symbol	Coded values				
		-2	-1	0	1	2
Pressure (Mpa)	$x_1$	16.1	23.5	30.9	38.3	45.7
Time (Min)	$x_2$	0	20	40	60	80
Ethanol conc.(%)	$x_3$	0	10	20	30	40

여기서 Y는 종속변수,  $x_1, x_2, x_3$ 은 독립변수,  $\beta_x$ 는 회귀계수이다.

회귀분석에 의한 모델식의 예측은 SAS (statistical analysis system, version 9.1) program을 이용하였고, 회귀분석 결과 임계점을 분석하여 최적점을 구하였다.

### 결과 및 고찰

#### 국내 감귤류로부터 flavonoid 함량의 분석

국내에서 재배되고 있는 감귤 품종에 따라 NHDC 생산을 위한 원료 물질로서 neohesperidin의 함량을 분석하였다. 감귤류에는 다양한 flavonoid가 존재하는 것으로 알려져 있으며, 현재까지 약 60여 종의 flavonoid가 분리되었고, 새로운 생리활성 물질이 계속적으로 발견되고 있다[14]. 감귤 착즙액의 flavonoid 함량은 수확시기가 늦어질수록 대부분 감소하는 경향을 보이거나 품종에 따라 과속이 될수록 함량이 다시 증가하는 품종도 있다고 보고되어 있다[22]. 또한 당유자와 평균티, 지각은 quercetagenin과 neohesperidin이 flavonoid 주성분으로 구성되어 있다고 밝혀졌다[16]. 따라서, 국내에서 주로 재배되고 있는 감귤 재배품종은 거의가 제주 재래종으로 당유자 감자 등 총 11 종의 감귤류를 이용하여 NHDC 생산을 위한 원료물질로서 사용 가능한 neohesperidin 함량을 분석하였다. 실험결과 당유자, 평균티, 지각 등에서 neohesperidin 함량이 0.87, 0.57, 0.69 g/100 g-DCW로 가장 높게 나타났으며, 제주산 주요 재배 품종인 일반조생은 0.25 g/100 g-DCW인 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 국내산 당유자, 평균티, 지각에서의 neohesperidin 함량이 각각 2.7~5.07, 0.66~2.67, 1.76~5.58 g/100 g-DCW이라는 류 등[22]의 결과와는 함량적 측면에서 다소 차이는 있지만 이러한 결과는 시료의 채취 및 추출 방법의 차이 때문으로 판단된다(Fig. 1). 국내 감귤류 중 neohesperidin의 확보를 위한 품종으로는 당유자, 평균티, 지각이 가장 적합하나 이들은 대부분 특용작물로서 재배되고 있기 때문에 원료수급의 문제점을 갖고 있다. 따라서 본 연구에서는 제주 감귤의 주 생산 품종인 일반조생의 부산물을 본 실험에 사용하였다.

#### Neohesperidin의 추출 수율 증가를 위한 반응표면분석

감귤가공부산물로부터 초임계 이산화탄소에 의한 neohesperidin의 추출에 미치는 영향을 분석하기 위하여 추출압력( $x_1$ ), 추출시간( $x_2$ ), 에탄올의 농도( $x_3$ )를 3가지 요인 변수로 설정하고 5수준의 실험계획을 수립하여 neohesperidin의 추출 수율을 측정하였다(Table 2). 각각의 독립변수에 대한 상수는 Table 1과 같다. Table 3은 추출 수율에 대한 분산분석 결과이며 결정계수(R-square)는 가정된 모형이 얼마나 잘 적합되는지를 수량화한 통계량으로 결과에서 92.81%로 100%에 가깝다 할 수 있으므로 가정된 반응모형이 결과에 적합함을 알

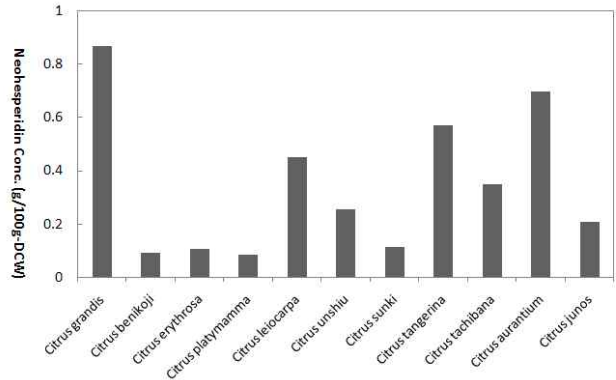


Fig. 1. Neohesperidin concentration of Korean citrus peel.

Table 2. Central composite design (CCD) and experimental results

RUN	Variable levels			Response
	$x_1$	$x_2$	$x_3$	Y
1	-1	-1	-1	48.4
2	-1	-1	1	55.1
3	-1	1	-1	54.7
4	-1	1	1	78.4
5	1	-1	-1	56.4
6	1	-1	1	69.7
7	1	1	-1	69.4
8	1	1	1	90.2
9	-2	0	0	40.5
10	2	0	0	84.4
11	0	-2	0	50.4
12	0	2	0	69.4
13	0	0	-2	41.6
14	0	0	2	69.9
15	0	0	0	64.5

수 있다.

변동계수(CV)는 반응변수의 평균값(Response Mean)에 대한 오차제곱합의 제곱근(Root MSE) 값을 나타낸다. 전체 모형에 대한 유의확률( $pr>F$ )은 0.05보다 작으면 가정된 모형반응이 자료에 적합하다고 할 수 있다. 반응표면분석의 결과값으로 실험 모델의 값이 0.021522이므로 반응 모형이 통계적으로 유의하다고 할 수 있다. 또한 실험의 결과값이 1차와 2차 곡선 모두 0.05보다 작으므로 결과적으로 모형에 대한 유의성이 높다고 예측할 수 있다(Table 3). 결과값에서 t-value는 해당 변수를 0으로 놓을 수 있는지에 대한 검정통계량으로 유의확률이 0.05보다 큰 값은 회귀식에서 모두 기각되었으며, 반응표면분석의 결과로써 추출수율에 대한 회귀식은 [식 5]와 같다.

$$Y = 68.62222 + 8.66626x_1 + 6.31876x_2 + 7.6687x_3 - 1.027778x_1x_1 + 0.4876x_1x_2 + 0.4626x_1x_3 - 1.665278x_2x_2 + 3.0626x_2x_3 - 2.702778x_3x_3 \quad [식 5]$$

Table 4는 추출 수율에 대한 정준 분석 결과로 critical value

Table 3. Results of ANOVA (analysis of variance) for RSM

Source	Master model					Predictive model				
	DF	SS	MS	F	Pr > F	DF	SS	MS	F	Pr > F
x <sub>1</sub>	1	1171.351	1171.351	26.07285	0.003751	1	1171.351	1171.351	26.07285	0.003751
x <sub>2</sub>	1	638.8256	638.8256	14.21949	0.013011	1	638.8256	638.8256	14.21949	0.013011
x <sub>3</sub>	1	916.5756	916.5756	20.40187	0.006301	1	916.5756	916.5756	20.40187	0.006301
x <sub>1</sub> *x <sub>1</sub>	1	11.70085	11.70085	0.260447	0.631538	1	11.70085	11.70085	0.260447	0.631538
x <sub>1</sub> *x <sub>2</sub>	1	1.90125	1.90125	0.04232	0.845125	1	1.90125	1.90125	0.04232	0.845125
x <sub>1</sub> *x <sub>3</sub>	1	1.71125	1.71125	0.03809	0.852945	1	1.71125	1.71125	0.03809	0.852945
x <sub>2</sub> *x <sub>2</sub>	1	30.71797	30.71797	0.683745	0.445953	1	30.71797	30.71797	0.683745	0.445953
x <sub>2</sub> *x <sub>3</sub>	1	75.03125	75.03125	1.670105	0.252744	1	75.03125	75.03125	1.670105	0.252744
x <sub>3</sub> *x <sub>3</sub>	1	80.91701	80.91701	1.801115	0.237294	1	80.91701	80.91701	1.801115	0.237294
Model	9	2897.723	321.9692	7.166646	0.021522	9	2897.723	321.9692	7.166646	0.021522
(Linear)	3	2726.752	908.9173	20.2314	0.003166	3	2726.752	908.9173	20.2314	0.003166
(Quadratic)	3	92.32736	30.77579	0.685032	0.598566	3	92.32736	30.77579	0.685032	0.598566
(Cross Product)	3	78.64375	26.21458	0.583505	0.651261	3	78.64375	26.21458	0.583505	0.651261
Error	5	224.6303	44.92607			5	224.6303	44.92607		
Total	14	3122.353				14	3122.353			

Fit statistics for Y

	Master Model	Predictive Model
Mean	62.86667	62.86667
R-square	92.81%	92.81%
Adj. R-square	79.86%	79.86%
RMSE	6.702691	6.702691
CV	10.66176	10.66176

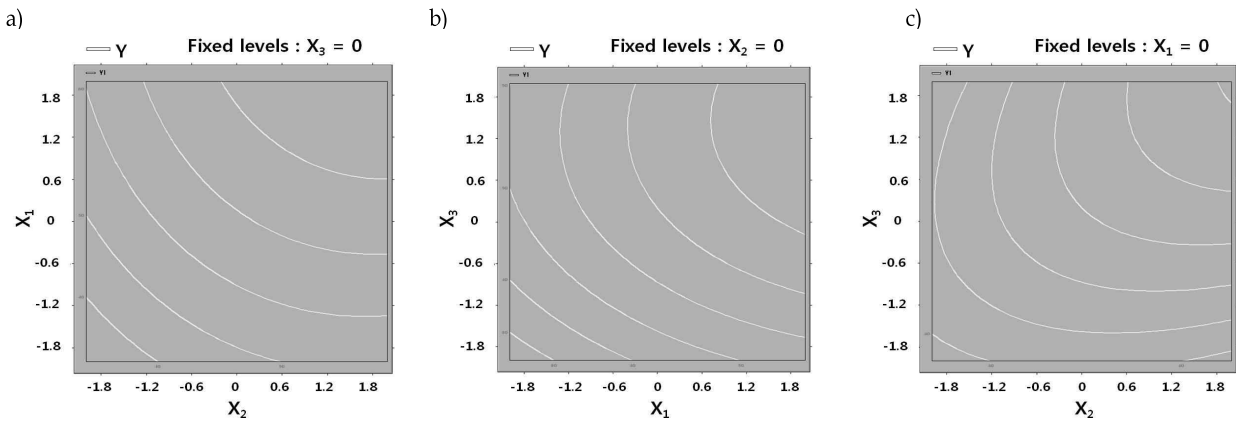


Fig. 2. Contour plots for optimization of neohesperidin extraction yield. a) Neohesperidin extraction yield by pressure and time, b) Neohesperidin extraction yield by pressure and ethanol concentration, c) Neohesperidin extraction yield by time and ethanol concentration

는 정상점의 좌표를 의미하며, 분석 결과 고유값(eigenvalues) 이 모두 음수이므로 최대점을 나타낸다. 따라서 정상점 좌표를 이용하여 변환식[식 1~3]에 대입하여 각각의 최적 조건을 찾았으며, 최적조건은 pressure는 93.99462 MPa, time은 253.066 min, ethanol 101.653%로써 추출압력과 시간과 보조 용매의 농도는 높을수록 추출 수율은 증가함을 확인할 수 있

었다. 최적조건의 결과값을 회귀식에 대입하여 최적조건에서의 최대 수율을 계산하면 1.62배 증가하였고, 정준 분석에 결과 찾은 최대값과 유사함을 확인할 수 있다. Fig. 2(a)는 pressure와 time에 따른 수율, Fig. 2(b)는 pressure와 ethanol 농도, Fig. 2(c)는 time과 ethanol 농도를 나타내는 등고선이고, Fig. 3(a)는 pressure와 time, Fig. 3(b)는 pressure와 ethanol 농도,

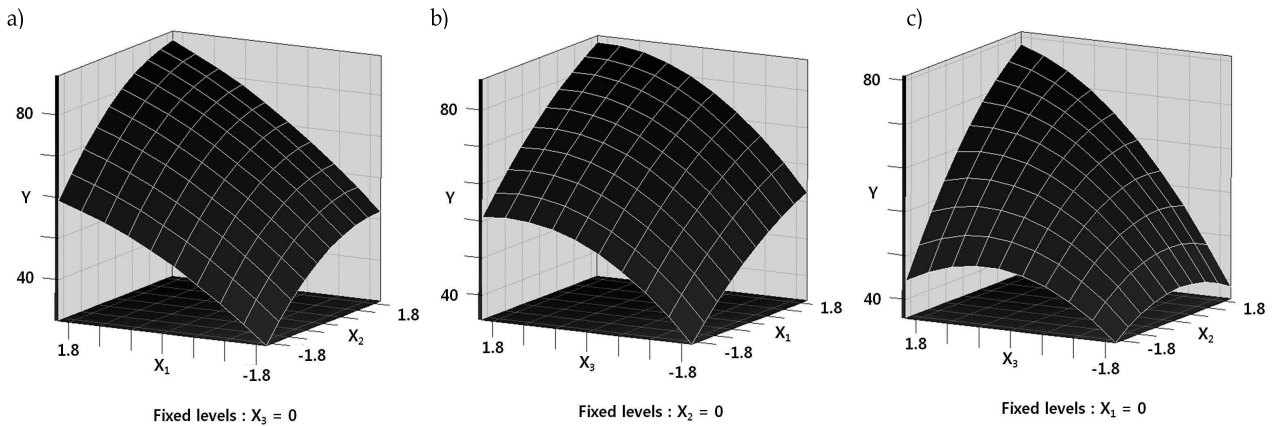


Fig. 3. Response surface plot for optimization of neohesperidin extraction yield. a) Neohesperidin extraction yield by pressure and time, b) Neohesperidin extraction yield by pressure and ethanol concentration, c) Neohesperidin extraction yield by time and ethanol concentration

Table 4. Result of canonical analysis of response surface based on coded data

Eigen vectors for Y			
Eigen values	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
-0.39269	0.46454	0.71600	0.52110
-1.20162	0.88539	-0.38666	-0.25802
-3.80153	-0.01675	-0.58124	0.81356
Critical value for Y			
Factor name	Coded	Uncoded	
x <sub>1</sub>	8.5263	8.5263	
x <sub>2</sub>	10.6533	10.6533	
x <sub>3</sub>	8.1653	8.1653	

Fig. 3(c)는 time과 ethanol 농도에 따른 결과를 3차원으로 표현한 그림이다.

이와 같이 실험 변수 요인들과 반응치 사이의 관계를 회귀 방정식을 이용하여 기술함으로써 모든 독립변수와 종속변수들 사이의 다중 회귀 상관관계는 1% 이내의 수준에서 통계적으로 높은 유의성이 있는 것으로 보아 실험 데이터는 이차방정식에 잘 부합됨을 알 수 있다. 세 가지 요인 변수 중 한 가지 변수를 일정하게 하고 다른 두 가지 변수의 함수로 반응을 나타냄으로써 3차원 그림으로 반응표면을 나타내었으며, 또한 분석결과 추출 압력의 증가에 따라 추출 수율은 증가하였는데, 추출 말기보다 추출 초기에 추출압력의 증가에 따른 추출 수율 증대 효과가 더욱 높았다. 이는 추출시간을 짧게 하였을 때는 추출 대상 성분들이 시료에 많이 남아 있으므로 추출 압력에 따른 추출수율 증대 효과가 보다 높게 나타난 것으로 사료된다.

한편 추출 압력과 동시에 추출시간의 증가에 따라 추출 수율은 점점 일정한 값에 이르는 경향을 보였다. 초임계 이산화탄소에 ethanol을 보조용매로 첨가하면 추출 효율이 급격히 증가하였는데, 이는 목적 성분에 대한 용해도를 증가시키고,

보조용매 분자들은 시료 조직에 존재하는 활성결합부위에서 목적 물질과 경쟁함으로써 목적 성분들과 시료 매트릭스간의 상호작용을 감소시켜 매트릭스의 구조의 변화를 초래함으로써 매트릭스로부터 목적 성분의 용출을 용이하게 하기 때문으로 판단된다[7,18]

### 감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 식품기술개발사업의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사 드립니다.

### References

- Bellocco, E., D. Barreca, G. Lagana, U. Leuzzi, E. Tellone, S. Ficarra, A. Kotyk, and A. Galtieri. 2009. Influence of L-rhamnosyl-D-glucosyl derivatives on properties and biological interaction of flavonoids. *Mol. Cell Biochem* **321**, 165-171.
- Braddock, R. J. and P. G. Crandall. 1981. Carbohydrate fiber from orange albedo. *J. Food Sci.* **46**, 650-655.
- Cha, J. Y., S. Y. Kim, S. J. Jeong, and Y. S. Cho. 1999. Effects of hesperetin and naringenin on lipid concentration in orotic acid treated mice. *Korean J. Life Sci.* **9**, 389-394.
- Chen, Y. T., R. L. Zheng, Z. L. Jia, and Y. Ju. 1990. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Radic. Biol. Med* **9**, 19-21.
- Francis, A. R., T. K. Shetty, and R. K. Bhattacharya. 1989. Modulating effect of plant flavonoids on the mutagenicity of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Carcinogenesis* **10**, 1953-1935.
- Guengerich, F. P. and D. H. Kim. 1990. *In vitro* inhibition of dihydropyridine oxidation and aflatoxin B1 activation in human liver microsomes by naringenin and other flavonoids. *Carcinogenesis* **11**, 2275-2279.
- Hawthorne, S. B. and D. J. Miller. 1994. Direct comparison of soxhlet and low-and high-temperature supercritical CO<sub>2</sub>

- extraction efficiencies of organics from environmental solids. *Anal. Chem* **66**, 4005-4012.
8. Horowitz, R. M. and B. Gentil. 1963. Dihydrochalcone derivatives and their use as sweetening agents. US Patent. 3,087,821.
  9. Itoh, K., M. Masuda, S. Naruto, K. Murata, and H. Matsuda. 2009. Antiallergic activity of unripe Citrus hassaku fruits extract and its flavanone glycosides on chemical substance-induced dermatitis in mice. *J. Nat. Med* **63**, 443-50.
  10. Itoh, K., N. Hirata, M. Masuda, S. Naruto, K. Wakabayashi, and H. Matsuda. 2009. Inhibitory effects of Citrus hassaku extract and its flavanone glycosides on melanogenesis. *Biol. Pharm. Bull.* **32**, 410-415.
  11. Jang, S. Y., S. M. Woo, C. W. Park, I. W. Choi, and Y. J. Jeong. 2010. Characteristics of alcohol fermentation of citrus fruit hydrolyzates. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **39**, 1236-1241.
  12. Jeong, S. M., S. Y. Kim, H. R. Park, and S. C. Lee. 2004. Effect of far-infrared radiation on the antioxidant activity of extracts from citrus unshiu peels. *J. Korean Soc. Food Sci.* **38**, 462-469.
  13. Jeong, W. S., S. W. Park, and S. K. Chung. 1997. The antioxidant activity of Korean citrus unshiu peels. *Food Biotechnol.* **6**, 292-296.
  14. Kim, Y. D., W. J. Ko, K. S. Koh, Y. J. Jeon, and S. H. Kim. 2009. Composition of flavonoids and antioxidative activity from juice of Juju citrus fruits during maturation. *Korean J. Nutr.* **42**, 278-290.
  15. Laura, B. 1998. Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **56**, 317-333.
  16. Lee, A., J. H., S. H. Kim, S. Y. Kim, and C. S. Jeong. 2009. Protective effects of neohesperidin and poncirin isolated from the fruits of Poncinus trifoliolate on potential gastric disease. *Phytother. Res.* **23**, 1748-1753.
  17. Lee, C. H. and Y. J. Kang. 1997. HPLC analysis of some flavonoids in citrus fruits. *Korean J. Postharvest Sci. Technol.* **4**, 181-187.
  18. Lim, S. B. and M. K. Jwa. 2003. Optimization in extraction conditions of carotenoids from Citrus unshiu press cake by supercritical carbon dioxide. *Korean J. Food Sci. Technol.* **35**, 1104-1109.
  19. Miyake, T., K. Yamamoto, N. Tsujihara, and T. Osawa. 1998. Protective effect of lemon flavonoids on oxidative stress in diabetic rats. *Lipids* **33**, 689-695.
  20. Monforte, M. T., A. Trovato, S. Kirjavaniien, A. M. Forestieri, E. M. I. Galati, R. B. Curto. 1995. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid hypolipidemic activity on experimental hypercholesterolemia in rat. *Famco* **50**, 595-599.
  21. Perfetti, G. A., F. L. Jr. Joe, T. Fazio, and S. W. Page. 1988. Liquid chromatographic methodology for the characterization of orange juice. *J. Assoc. Off. Anal. Chem* **71**, 469-473.
  22. Rhyu, M. R., E. Y. Kim, I. Y. Bae, and Y. K. Park. 2002. Contents of naringin, hesperidin and neohesperidin in premature Korean citrus fruits. *Korean J. Food Sci. Technol.* **31**, 132-135.
  23. Son, H. S., H. S. Kim, T. B. Kwon, and J. S. Ju. 1992. Isolation, purification and hypotensive effects of bioflavonoids in Citrus sinensis. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **21**, 136-142.
  24. Son, H. S., S. H. Lee, Y. B. Park, K. H. Bae, K. H. Son, T. S. Jeong, and M. S. Choi. 1999. Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase and acyl CoA cholesterol transferase are lower in rat fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. *J. Nutr.* **129**, 1182-1185.
  25. Wang, C., Y. Pan, G. Fan, Y. Chai, and Y. Wu. 2010. Application of an efficient strategy based on MAE, HPLC-DAD-MS/MS and HSCCC for the rapid extraction, identification, separation and purification of flavonoids from Fructus Aurantii Immaturus. *Bioimed Chromatogr.* **24**, 235-244.

#### 초록 : 반응표면 분석법을 이용한 neohesperidin 생산 수율의 최적화

양희종 · 정성엽 · 최낙식 · 안극현 · 박찬선 · 윤병대 · 유연우<sup>1</sup> · 안순철<sup>2</sup> · 김민수\*

(한국생명공학연구원 생물산업공정센터, <sup>1</sup>아주대학교 분자과학기술사업단, <sup>2</sup>부산대학교 의과대학 미생물학 및 면역학교실)

감귤류는 다양한 기능성과 약효로써의 효능이 입증되면서 소비가 증가하고 있으나, 감귤 가공 후 부산물인 감귤박은 폐기물로써 해양에 투기되고 있어 부산물의 처리가 시급한 실정이다. 따라서 폐감귤박을 이용한 고감도 감미료의 생산 원료인 neohesperidin을 추출하여 폐감귤박을 효율적 이용을 도모하였으나 상당히 미비한 추출 수율로 효율성이 감소하였다. 이러한 추출 수율의 문제점을 해결하기 위하여 반응표면 분석법을 이용하여 감귤 가공부산물로부터 neohesperidin의 추출 수율 증진 위한 추출조건의 최적화 연구를 수행하였다. 추출 조건 중 초임계 유체 추출의 수율 증진에 영향을 주는 추출 압력( $x_1$ ), 추출 시간( $x_2$ ), 보조용매의 농도( $x_3$ )를 주요 인자로 선정하였다. 선정한 인자를 반응표면 분석법에 적용하여 추출 수율의 최적조건을 탐색하였으며, 그 결과 추출 압력이 증가하면서 추출의 수율은 크게 향상되었고, 또한 추출 시간이 길어질수록 추출 수율 또한 증가함을 확인하였다. 또한 초임계 이산화탄소에 ethanol을 보조용매로 첨가할 경우 보조용매의 농도가 높을수록 수율은 급격하게 증가하여, 최종적으로 162.22%까지 neohesperidin의 추출 수율을 증진할 수 있었다.